

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 63-048451

(43)Date of publication of application : 01.03.1988

(51)Int.Cl.

G01N 30/48
B01J 20/26
C12N 11/10
// C07K 3/20
C07K 17/10

(21)Application number : 61-192141

(71)Applicant : SHOWA DENKO KK

(22)Date of filing : 19.08.1986

(72)Inventor : MORIGUCHI SOYAO
SUZUKI HIROSHI
WATANABE HIROKO

(54) ADSORPTION CARRIER FOR CHROMATOGRAPHY

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain an adsorption carrier for chromatography which is hard and has good flowability and sepn. characteristic by using crosslinked or non- crosslinked chitosane porous beads as a base body and covalent-bonding protein A to such base body.

CONSTITUTION: The chitin contained in the carapace of Crastacea and Insecta is subjected to a deacetylation treatment to obtain the chitosane porous beads consisting of polyglucosamine. The chitosane porous beads are otherwise subjected to a crosslinking treatment by using a dicarboxylic acid, dialdehyde, etc., to obtain the acid resistant chitosane porous beads. An alkane dicarboxylic anhydride is acted on the amino group contained in these porous beads to convert the same to an active supporting group having a carboxyl group. After the remaining amino group is acylated, the protein A is covalent-bonded to the carboxyl group.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭63-48451

⑬ Int. Cl.⁴
G 01 N 30/48
B 01 J 20/26
C 12 N 11/10
// C 07 K 3/20
17/10

識別記号

庁内整理番号

Z-7621-2G
7106-4G
7133-4B
8318-4H
8318-4H

⑭ 公開 昭和63年(1988)3月1日

審査請求 未請求 発明の数 1 (全4頁)

⑮ 発明の名称 クロマトグラフィー用吸着担体

⑯ 特 願 昭61-192141

⑰ 出 願 昭61(1986)8月19日

⑱ 発 明 者 森 口 征 矢 生 東京都大田区多摩川2-24-25 昭和電工株式会社総合技術研究所内

⑲ 発 明 者 鈴 木 広 志 東京都大田区多摩川2-24-25 昭和電工株式会社総合技術研究所内

⑳ 発 明 者 渡 辺 浩 子 東京都大田区多摩川2-24-25 昭和電工株式会社総合技術研究所内

㉑ 出 願 人 昭和電工株式会社 東京都港区芝大門2丁目10番12号

㉒ 代 理 人 弁理士 菊地 精一

明 細 書

1. 発明の名称

クロマトグラフィー用吸着担体

2. 特許請求の範囲

キトサン多孔性ビーズであって、該キトサンを構成するグルコサミンに基づくアミノ基に、またはキトサン多孔性ビーズを架橋処理したものであって、該キトサンを構成するグルコサミンに基づくアミノ基及び／または架橋処理剤に基アミノ基に結合基を介して共有結合により結合したプロテインAを含有するキトサン多孔性ビーズから成ることを特徴とするクロマトグラフィー用吸着担体。

3. 発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明は、アフィニティークロマトグラフィーに利用することのできるクロマトグラフィー用吸着担体に関する。

従来の技術

クロマトグラフィー技術の1つとして、アフィニティークロマトグラフィーは互いに特異的に相

互作用を及ぼし合う物質対の親和性を利用して分離・精製を行なうものであり、例えば生体物質をその生物学的特性即ち分子上のある特定の化学構造を識別して精製する場合に有用である。

アフィニティークロマトグラフィー用吸着担体(アフィニティーゲル)は、例えば不溶性の担体(マトリックス)に結合基(スペーサー)を結合させて得られる活性支持体の前記スペーサーにリガンドを結合させたものであり、このリガンドと互いに相互作用を及ぼし合う物質の組合せを選択して吸着操作を行なう。

リガンドの1つとして、プロテインAは *Staphylococcus aureus* の細胞壁から得られる蛋白質であるが免疫グロブリンに対して強い吸着を示す性質を有する為、プロテインAをリガンドとして結合させたアフィニティークロマトグラフィーは免疫機構の関連した研究の手段として有用なものと考えられている。

例えばプロテインAをリガンドとし、IgGを吸着目的物質とするようなアフィニティークロマト

グラフィーによる分離・精製や分析において、前記アフィニティークロマトグラフィー用吸着担体の主構成成分である活性支持体に望まれる性質としては、非特異的吸着が少ないこと、高い多孔性を有すること、リガンドの結合が容易であり固定化可能容量が大きいこと、化学的に安定でpH域、塩濃度、温度の広範な条件下で十分安定であり体積変化がないこと、十分な機械的強度と安定性を有し流動特性が良いこと、生物学的汚染に耐えること、などが挙げられる。

従来よりアフィニティークロマトグラフィー用吸着担体の基材として用いられているセルロース、デキストラン、ポリアクリルアミド、アガロース等は、必ずしもこれら望まれる性質を具有していない。とりわけ、硬さが不足した所謂ソフトゲルであるため流動特性が悪く、分離特性が良くないという重大な欠点を有し、また寿命も短い。

更に、近年用いられているシリカビーズは、硬さの点では満足できるものの、アルカリ性条件下では使用できないため、分離条件や抽出・洗浄の

条件の選択に大きな制約が加わるという問題点を有していた。

発明が解決しようとする問題点

本発明の目的は、前記従来のクロマトグラフィー用吸着担体の欠点を克服して、アフィニティークロマトグラフィー用吸着担体に望まれる前述した諸性質を十全に具有するクロマトグラフィー用吸着担体を提供することにある。

問題点を解決するための手段

本発明によって上記目的を達成し得るクロマトグラフィー用吸着担体が提供される。

即ち、本発明は、キトサン多孔性ビーズであって、該キトサンを構成するグルコサミンに基くアミノ基に、またはキトサン多孔性ビーズを架橋処理したものであって、該キトサンを構成するグルコサミンに基くアミノ基及び／または架橋処理剤に基くアミノ基に結合基を介して共有結合により結合したプロテインAを含有するキトサン多孔性ビーズから成ることを特徴とするクロマトグラフィー用吸着担体に関する。

以下、本発明のクロマトグラフィー用吸着担体について説明する。

本発明に係るキトサン多孔性ビーズは、甲殻類や昆虫類などの甲皮に含まれるキチンを脱アセチル処理して得られるポリグルコサミンより成るものであり、耐酸性を持たせる為、二官能性試薬、例えばジカルボン酸およびその誘導体、ジアルデヒド、ジイソシアナート等を用いて架橋処理を施したのも製造されており、例えば粒径0.1～3.0 μ m、孔径500～3000 \AA の多孔性ビーズとして入手が可能である。このキトサン多孔性ビーズは、一般に数 μ ～数10 μ mol当量/gのグルコサミンに基くアミノ基または架橋処理を施したもののについては架橋処理剤に基くものも含めてアミノ基を有しており、これらのアミノ基はアルカンジカルボン酸無水物を用作用させることにより、カルボキシル基を有する活性支持基に変換することができる。

反応の溶媒としては通常水が用いられるが、その他テトラヒドロフラン、ジオキサンなどのエー

テル類、酢酸などのカルボン酸類、ピリジンなども用いられる。また、特に触媒は用いなくてもよいが、塩酸、硫酸などの酸や、水酸化ナトリウムや炭酸カリウムなどのアルカリの添加により反応液のpHを調整することもできる。

反応に用いられるアルカンジカルボン酸無水物としては、コハク酸無水物、グルタル酸無水物、アジピン酸無水物、ピメリン酸無水物、スベリン酸無水物、アゼライン酸無水物、セバシン酸無水物、1,10-デカンジカルボン酸無水物、1,12-ドデカンジカルボン酸無水物、1,14-テトラデカンジカルボン酸無水物などを例示することができる。

反応条件については必ずしも制限はないが、一般に次のような条件を選択して反応を行なうのが好ましい。

キトサン多孔性ビーズの重量(a)とアルカンジカルボン酸無水物の重量(b)の比：

$$a : b = 1 : 0.05 \sim 10,$$

より好ましくは、

$$a : b = 1 : 0.1 \sim 3,$$

反応温度：0～150℃、より好ましくは室温～100℃

反応時間：1～60時間、より好ましくは1～30時間、

反応圧力：常圧～10atm、より好ましくは常圧。

反応後の後処理についても特別な要件は無く、濾別、洗浄等通常行なわれている方法にて適宜実施される。

以上により得られたカルボキシル基を有するキトサン多孔質ビーズは、次いでモノカルボン酸無水物またはハロゲン化アシルを作用させることにより、残余のアミノ基をアシル化することができる。

このときの反応の条件は、前述のアルカンジカルボン酸無水物の場合と同様にして行うことができるが、アシル化剤としてハロゲン化アシルを用いる場合は溶媒としては水以外のものを用いた方がよく、また触媒としてはアルカリが好ましい。

反応に用いられるモノカルボン酸無水物として

は、無水酢酸、無水プロピオン酸、無水酪酸などが例示され、またハロゲン化アシルとしては、塩化アセチル、臭化アセチル、塩化プロピオニル、塩化ブチリルなどを例示することができる。

カルボキシル基にプロテインAを共有結合させるに際しては、適宜縮合剤や反応試薬などを用いて適当な溶媒下で行なうことができる。縮合剤や反応試薬としては、例えばN-ヒドロキシコハク酸イミド、ジシクロヘキシルカルボジイミド、または1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド等々を例示することができる。また溶媒としては通常水が用いられるが必要に応じてリン酸や酢酸緩衝液として用いることもでき、また塩化ナトリウムなどの無機塩類を添加して用いることも可能である。

プロテインAとの反応条件については必ずしも制限は無いが、一般に次のような範囲で行なうことが適当である。

カルボキシル基を結合させた本発明に係るキトサン多孔質ビーズとプロテインAの重量比：1：

0.03～0.3、好ましくは1：0.05～0.2；反応温度：0℃～室温、好ましくは4℃～室温；反応時間：1：72時間、好ましくは2～12時間。

反応後の後処理についても特別な要件は無く、濾別、洗浄等通常行なわれている方法にて適宜実施される。

発明の効果

本発明により提供されるクロマトグラフィー用吸着担体は、前述のアフィニティークロマトグラフィー用吸着担体として望まれる性質を具備する基剤を用い、これに適当な結合基を介してプロテインAを共有結合させたものである為、本発明の吸着担体を用いることにより、従来のフソトゲルを用いた吸着担体と同じようなアフィニティークロマトグラフィー用充填剤として使用できるばかりでなく、特に耐圧カラムに充填し、加圧下でも充分使用することができるということは、作業時間を大巾に短縮させる為、従って分離精製の能率を大きく向上させ得るという最大の利点が見られるものであり、この利点が例えば高速液体クロマ

トグラフィーへの応用や工業用の分離精製設備への応用を計るには不可欠であることは言を俟たない。

また、本発明により提供されるクロマトグラフィー用吸着担体は、キトサン多孔質ビーズの有するアミノ基を完全にアシル化することにより、例えば蛋白質等と接触する際のイオンの非特異的吸着をも排除している為、リガンドと吸着目的物質の選択性を更に高めたものとするができる。更に、特に、キトサン多孔質ビーズに対し、やはり前記の如く結合剤を介して化学的に中性で安定な共有結合を介してプロテインAを結合させた吸着担体は、例えば、一般に用いられている臭化シアノやグルタルアルデヒドを介したアフィニティークロマトグラフィー用吸着担体などに比して、使用時のリガンドの脱落が無く、また結合基の長さを任意に調整することが可能である為、リガンドの目的物質に対する吸着能が優れており、更に非特異的吸着も少ないこと等も併せて本発明により提供されるクロマトグラフィー用吸着担体の効

果は大きい。

実施例

以下に、本発明のクロマトグラフィー用吸着担体の製造法について代表的な例を示し、更に具体的に説明する。但し、これらは説明の為の単なる例示であって、本発明はこれらに何ら制限されないのは言うまでもない。

実施例 1

粒径 0.1 mm のキトサン多孔性ビーズ（商品名シロウデックスキトパール、芳香族架橋品）に無水グルタル酸を反応させた後、残アミノ基をアセチル化して得たビーズ（カルボキシル基：乾燥ゲル 1 g 当り 0.35 ミリモル）1.0 g を無水ジオキサンで充分洗浄した後、無水ジオキサン 4 ml 中に加え、更に N-ヒドロキシコハク酸イミド 80 mg 及びジシクロヘキシルカルボジイミド 144 mg を加えて室温で 2 時間振盪した。次いでビーズを濾取し無水ジオキサン 20 ml、メタノール 6 ml、冷水 3 ml の順で素早く洗浄した。このビーズをプロテイン A 10 mg の 0.01 モル炭酸水素ナトリ

ウムの水 2 ml における溶液に加え室温で 2 時間振盪後、4℃で 1 夜放置した。ビーズを濾取し 1 モル塩化ナトリウム水溶液及び水で洗浄した後、1 モルトリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) 2 ml に加え室温で 1 時間振盪した後、再びビーズを濾取して水洗した。

こうして得られた吸着担体は乾燥ビーズ 1 g 当りプロテイン A を 6.0 mg 担持させていることが未反応による回収プロテイン A の量から確かめられた。

試験例 1

実施例で得られた吸着担体を 8 φ × 50 mm のステンレス製カラムに充填し、高速液体クロマトグラフ装置を用いてヒト IgG を分析したところ、図 1 のようなクロマトグラムが得られた。分析条件：溶離液① 0.01 モル酢酸ソーダ/塩酸緩衝液 pH 7.0、溶離液② 0.01 モル酢酸ソーダ/塩酸緩衝液 pH 3.0、溶離速度 0.5 ml/min、検出器紫外分光光度計 280 nm

試験例 2

アシル化されていないアミノ基を含む吸着体を用い試験例 1 と同様な方法でヒト IgG の代りにヒト血清を分析したところ、図 2 のようなクロマトグラムが得られた。次いで溶離液②で溶出された分画を再度試験例 1 のカラムで分析したところ（図 3）、溶離液①で溶出されるピークがあった。これは遊離のアミノ基と非特異的にイオン結合していたタンパク質に依るものと思われる。

4. 図面の簡単な説明

図 1 は本発明によるプロテイン A 吸着体を用いてヒト IgG を分析したものである。

図 2 はヒト血清をアシル化されていないアミノ基を含む吸着体で分析したクロマトグラムである。

図 3 は図 2 で溶離液①で吸着され溶離液②で溶出された分画を再度本発明のカラムで分析したクロマトグラムである。

特許出願人 昭和電工株式会社
代理人 弁理士 菊地 精一

